



**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

03380310.7

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

BEST AVAILABLE COPY



Anmeldung Nr.:
Application no.: 03380310.7
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 30.12.03
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Medplant Genetics S.L.
Parque Tecnológico de Zamudio,
Edificio 801
48160 Derio (Vizcaya)
ESPAGNE
UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO
Campus de Leioa
48940 Leioa (Vizcaya)
ESPAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Methods for the in vitro diagnosis and prognosis of demyelinating diseases and
for the development of drugs against demyelinating diseases

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)

Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

G01N33/48

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PT RO SE SI SK TR LI

Bemerkungen:

Remarks: The application was transferred from the above mentioned original applicant to:
Remarques: Progenika Biopharma, S.A. - Derio (Vizcaya)/ ES
UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO - Leioa (Vizcaya)/ES
The registration of the changes has taken effect on 29.10.2004

MÉTODOS PARA EL DIAGNOSTICO IN VITRO Y PRONÓSTICO IN VITRO DE ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES, Y PARA EL DESARROLLO DE FÁRMACOS CONTRA ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para detectar la presencia de enfermedades desmielinizantes en un individuo para determinar el estadio o la severidad de dichas enfermedades en el individuo, o para monitorizar el efecto de la
10 terapia administrada a un individuo que presente dichas enfermedades; a la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de dichas enfermedades, con el fin de desarrollar nuevos medicamentos; así como a agentes que inhiben la expresión y/o la actividad de la
15 proteína DUSP6, y/o los efectos de esta expresión. Los métodos y agentes de la invención se aplican preferentemente a la esclerosis múltiple.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Las enfermedades desmielinizantes son aquellas en las que el proceso patogénico principal provoca la destrucción de la vaina de mielina, que es necesaria para la integridad de las células del Sistema Nervioso Central. Las principales enfermedades desmielinizantes son: esclerosis múltiple, síndrome de Devic,
25 enfermedad de Baló, enfermedad de Marchiafava-Bignami, mielinolisis central pontina, encefalomiелitis aguda diseminada, encefalomiелitis hemorrágica necrotizante aguda. Entre ellas, la esclerosis múltiple es la enfermedad por alteración de la mielina en el sistema nervioso central más frecuente y, con la excepción
30 de los traumatismos, ésta es la causa más frecuente de discapacidad neurológica en adultos jóvenes. Se estima que aproximadamente el 75% de los casos de enfermedades desmielinizantes corresponden a esclerosis múltiple.

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central más frecuente. Afecta a un millón y medio de personas en el mundo, y sus síntomas aparecen en general en adultos jóvenes, por lo que sus consecuencias a nivel personal y socioeconómico son muy graves (Noseworthy et al. 2000 New Engl. J. Med., 343, 938-952).

La susceptibilidad a la EM se debe a factores genéticos y ambientales desconocidos. La prevalencia de la enfermedad se sitúa entre 50 a 100 personas por cada 100.000 habitantes en las regiones de alto riesgo, que se localizan principalmente en las zonas septentrionales del hemisferio norte, en Europa y América. El riesgo a padecer EM aumenta 10-20 veces en parientes de primer grado de enfermos, y la concordancia entre gemelos monocigóticos (idénticos genéticamente) se eleva hasta el 30-35%, mientras que gemelos dicigóticos sólo alcanza el 2-5% (Noseworthy et al. 2000 New Engl. J. Med., 343, 938-952). La susceptibilidad genética no está caracterizada. Hasta el momento se tienen evidencias de que puede residir en algún polimorfismo de los genes que codifican antígenos leucocitarios humanos (HLA), glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG) y otros genes de los cromosomas 10 y 15 (Steinman 2001, Nature Immunol 2, 762-764).

Existe un consenso entre los investigadores de la EM según el cual la enfermedad tiene dos fases, una inicial inflamatoria, de naturaleza autoinmune, y otra secundaria neurodegenerativa progresiva. En la primera, las células T activadas atraviesan la barrera hematoencefálica, y una vez dentro del Sistema Nervioso Central liberan citoquinas proinflamatorias que desencadenan una cascada inmunológica que termina en la destrucción de la mielina y muerte de los oligodendrocitos. El conocimiento con un cierto detalle del proceso autoinmune ha servido para desarrollar agentes de naturaleza inmunomoduladora cuya eficacia terapéutica es muy modesta. Hasta ahora se han descrito diversas dianas para la intervención durante la fase inflamatoria de la EM (Zamvil y Steinman, 2003, Neuron 38, 685-688). Entre ellas se encuentran las que se dirigen a reducir la inflamación del sistema nervioso

iniciada por la activación de células T específicas de mielina, que promueven la autoinmunidad en particular contra componentes de la mielina, penetran en el tejido nervioso central y liberan en él citoquinas proinflamatorias como el interferon- γ y el factor de la necrosis tumoral- α . El inmunomodulador interferón- 1β , aprobado para el tratamiento de la EM remitente-recurrente, previene también las interacciones celulares que llevan a la penetración de las células T activadas a través del endotelio vascular. Otros tratamientos en fase de ensayo clínico están dirigidos a neutralizar la actividad de las citoquinas proinflamatorias y/o a potenciar las antiinflamatorias. Sin embargo, no se ha generado ningún medicamento que retrase o detenga el avance de la fase neurodegenerativa de la enfermedad que cursa con deterioro neurológico progresivo e invalidez, y que se caracteriza por la aparición de lesiones desmielinizantes graves en la sustancia blanca con pérdida masiva de oligodendrocitos, atrofia y daño axonal severo.

El ácido glutámico es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central. Activa una amplia familia de receptores bien caracterizados a nivel molecular y funcional (Dingledine et al., 1999, Pharmacol. Rev. 51:7-61.), y es eliminado del espacio extracelular mediante transportadores (Danbolt, 2001, Prog. Neurobiol 65, 1-105). La disminución en la eficacia del transporte del ácido glutámico puede provocar la sobreexcitación de los receptores y desencadenar la muerte neuronal. Este fenómeno es relevante en la etiología de algunos trastornos neurológicos, entre los que se incluyen las enfermedades neurodegenerativas (Lee et al., 1999, Nature 399:A7-14).

Los oligodendrocitos son las células responsables de la mielinización del sistema nervioso central, y su muerte provoca alteraciones graves en la comunicación nerviosa. Al igual que las neuronas, los oligodendrocitos expresan receptores del ácido glutámico y transportadores del mismo, cuya entidad molecular hemos caracterizado en los últimos años. Así mismo, se ha

observado que la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos causa muerte oligodendroglial. Estos resultados han llevado a postular que la homeostasis del ácido glutámico es fundamental para prevenir la posible excitotoxicidad oligodendroglial, y que ésta puede ser una componente en la etiopatogenia de las enfermedades desmielinizantes (revisado en Matute et al., 2001, Trends Neurosci. 24:224-230; Matute et al., 2002, Eur. J. Pharmacol, 447:239-246). Por tanto, la plena comprensión del proceso excitotóxico puede aportar datos importantes, que entre otras cosas sirvan para el establecimiento de posibles dianas terapéuticas sobre las que actuar mediante el desarrollo de nuevos fármacos.

La excitotoxicidad puede estar mediada por receptores glutamatérgicos del tipo NMDA, AMPA o kainato. En los oligodendrocitos, sólo participan los dos últimos, pues estas células carecen de receptores de NMDA (Sánchez-Gómez y Matute, 1999, Neurobiol. Dis. 6:475-485) y la muerte excitotóxica de estas células es provocada por una sobrecarga en los niveles de calcio citosólico (Alberdi et al., 2002, Neurobiol. Dis. 9:234-243). El incremento excesivo de este metabolito provoca la activación de proteasas, lipasas y endonucleasas, que pueden dañar la proteínas estructurales, la membrana y el DNA respectivamente. A su vez, la muerte celular excitotóxica puede ocurrir mediante apoptosis o necrosis. Sin embargo, no se conocen bien los mecanismos celulares que llevan a uno u otro proceso, ni las moléculas que intervienen.

La existencia de modelos experimentales *in vivo* de daño excitotóxico permite examinar la relevancia de los hallazgos obtenidos con los estudios realizados en cultivos de oligodendrocitos. Así, la infusión de excitotoxinas en el nervio óptico produce desmielinización en placas similar a las lesiones de la EM (Matute, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10229-10234). Por otra parte, los procesos isquémicos que afectan al sistema nervioso central producen daño excitotóxico masivo a la población oligodendroglial (Li y Stys, 2000, J. Neurosci. 20:1190-1198). Finalmente, la encefalomielitis autoinmune experimental

... produce desmielinización que puede reducirse en gran medida mediante la administración de antagonistas de los receptores glutamatérgicos (Pitt et al., 2000, Nat. Med. 6:67-70; Smith et al., 2000, Nat. Med. 6:62-66). En su conjunto, los estudios en
5 modelos celulares y animales de enfermedades desmielinizantes indican que la muerte excitotóxica de los oligodendrocitos es una componente en la etiología de estas enfermedades y en particular, de la EM.

Las familia de fosfatasas DUSP (abreviatura de su nombre en
10 inglés *dual specificity protein tyrosine phosphatases*) están implicadas en la regulación de kinasas activadas por señales extracelulares (ERK), por estrés celular (JNK/SAPK) y por mitógenos (MAPK). Estas kinasas se activan por fosforilación reversible de treoninas y tirosinas y se inactivan por DUSPs que
15 defosforilan estos mismos residuos (Muda et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:27205-27208). Al igual que las kinasas que regulan, las DUSPs se han relacionado con diferenciación celular, regeneración y apoptosis. En relación con este último proceso biológico, se ha observado que la DUSP6 (también conocida como MKP-3, o MAP quinasa
20 fosfatasa-3, (código de GeneBank rata NM_053883, humana NM_001946) tiene una localización citosólica e induce apoptosis en células endoteliales en respuesta a citoquinas proinflamatorias por un mecanismo que en último extremo causa proteólisis de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Rossig et al., 2000, J. Biol. Chem.
25 275:25502-25507). Sin embargo, nunca se ha asociado el gen *dusp-6*, o la proteína que codifica, DUSP-6, a procesos de apoptosis en células nerviosas, o a procesos o enfermedades desmielinizantes

Los autores de la presente invención han descubierto, tras laboriosa investigación y empleando diferentes técnicas (DNA-chips
30 y RT-PCR cuantitativa para medir los niveles de expresión génica, así como ensayos de inhibición de muerte celular por apoptosis), que la expresión del gen *dusp6* se incrementa tras estímulos excitotóxicos en un cultivo puro de oligodendrocitos y que el bloqueo de su expresión rescata a estas células de la muerte por
35 apoptosis; así como que la expresión génica de *dusp-6* está

incrementada en muestras de cerebro post-mortem procedentes de individuos humanos afectados de esclerosis múltiple, al compararla con la expresión en muestras de cerebro post-mortem procedentes de individuos humanos no afectados de esclerosis múltiple. Estas evidencias convierten a *dusp6* y a la proteína que codifica, DUSP6, en una útil diana para el desarrollo de nuevos métodos *in vitro* de búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de las enfermedades desmielinizantes, en particular para la esclerosis múltiple, con el fin de desarrollar nuevos medicamentos.

La presente invención proporciona por tanto un método *in vitro* de alta sensibilidad para detectar la presencia de enfermedades desmielinizantes en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dichas enfermedades en el individuo, para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dichas enfermedades, o para decidir qué pacientes de enfermedades desmielinizantes son susceptibles de ser tratados con fármacos desarrollados para inhibir la expresión y/o la actividad de la proteína DUSP6, y/o los efectos de esta expresión. Los métodos y agentes de la invención se aplican preferentemente a la esclerosis múltiple.

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención tiene como objeto principal el desarrollo de un método *in vitro* para detectar la presencia de enfermedades desmielinizantes para determinar el estadio o la severidad de dichas enfermedades en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dichas enfermedades.

Un segundo objeto de la presente invención es un método *in vitro* para buscar, identificar, desarrollar y evaluar la eficacia de compuestos para la terapia de las enfermedades desmielinizantes.

Un objeto adicional de la invención reside en el uso de secuencias derivadas del gen *dusp6* para el diagnóstico y

pronóstico *in vitro* de enfermedades desmielinizantes; así como para la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para la terapia de dichas enfermedades.

Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar
5 agentes caracterizados porque inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína DUSP6, para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.

Por último, es también objeto de la invención una composición
10 farmacéutica que comprenda uno o varios agentes terapéuticos junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Curva de desnaturalización del producto de la PCR
15 del gen de referencia, GADPH ($T_m = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$) (figura 1a) y del gen diana, dusp-6 ($T_m = 77\text{ }^{\circ}\text{C}$) (figura 1b), en experimentos de medida de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. En el eje de abscisas se representa la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y en el eje de ordenadas la fluorescencia ($d(F1)/dT$).

Figura 2. Cálculo de la eficiencia de amplificación de las
20 reacciones de PCR de dusp-6, en experimentos de medida de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Recta patrón obtenida para los datos de dusp-6. En el eje de abscisas se representa el logaritmo de la concentración y en el eje de
25 ordenadas el punto de corte.

Figura 3. Efecto de los oligonucleótidos antisentido contra la caspasa-3 (figura 3a) y contra dusp-6 (figura 3b) sobre el proceso de muerte oligodendroglial tras estimulación con AMPA $10\text{ }\mu\text{M}$ + CTZ $100\text{ }\mu\text{M}$ durante 15 min. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 3-5$.

Figura 4. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de
30 dusp6 humana (NM_001946) y de rata (NM_053883)

Figura 5. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de dusp6 humana (NP_001937) y de rata (NP_446335)

Figura 6. Expresión del gen dusp6 en nervio óptico humano
35 postmortem. C, controles, EM, esclerosis múltiple.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para facilitar la comprensión de la presente solicitud de patente, exponemos a continuación el significado de algunos términos y expresiones en el contexto de la invención:

5 Los términos "sujeto" o "individuo" se refieren a miembros de especies de animales mamíferos, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.

10 La expresión "enfermedades desmielinizantes" se refiere a aquellas enfermedades en las que el proceso patogénico principal provoca la destrucción de la mielina, que es la capa lipoproteica que recubre los nervios y facilita la transmisión de los impulsos a través de las fibras nerviosas. En el ámbito de la presente
15 invención, las enfermedades desmielinizantes incluyen: esclerosis múltiple, síndrome de Devic, enfermedad de Baló, enfermedad de Marchiafava-Bignami, mielinolisis central pontina, encefalomiелitis aguda diseminada, encefalomiелitis hemorrágica necrotizante aguda.

20 El término "gen" se refiere a una cadena molecular de desoxirribonucleótidos, que codifica una proteína.

El término "DNA" se refiere al ácido desoxirribonucleico. Una secuencia de DNA es una secuencia de desoxirribonucleótidos.

25 El término "cDNA" se refiere a una secuencia de nucleótidos, complementaria a una secuencia de mRNA.

El término "RNA" se refiere al ácido ribonucleico. Una secuencia de RNA es una secuencia de ribonucleótidos.

El término "mRNA" se refiere al ácido ribonucleico mensajero, que es la fracción del RNA total que se traduce a proteínas.

30 La frase "mRNA transcrito de" se refiere a la transcripción del gen (DNA) en mRNA, como primer paso para que el gen se exprese y traduzca a proteína.

35 El término "secuencia de nucleótidos" o "secuencia nucleotídica" se refiere indistintamente a una secuencia de ribonucleótidos (RNA) o de desoxirribonucleótidos (DNA).

El término "proteína" se refiere a una cadena molecular de aminoácidos, unidos por enlaces covalentes o no covalentes. El término incluye todas las formas de modificaciones post-traduccionales, por ejemplo glicosilación, fosforilación o acetilación.

Los términos "péptido" y "polipéptido" se refieren a cadenas moleculares de aminoácidos que representan un fragmento proteico. Los términos "proteína" y "péptido", se usan indistintamente.

El término "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que exhibe una actividad de unión específica por una proteína particular, a la que se denomina "antígeno". El término "anticuerpo" comprende anticuerpos monoclonales, o anticuerpos policlonales, intactos, o fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano. Los "anticuerpos monoclonales" son poblaciones homogéneas de anticuerpos, altamente específicos, que están dirigidos contra un único sitio o "determinante" antigénico. Los "anticuerpos policlonales" incluyen poblaciones heterogéneas de anticuerpos, que están dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos.

El término "epítipo", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un determinante antigénico de una proteína, que es la secuencia de aminoácidos de la proteína que un anticuerpo específico reconoce.

El término "fase sólida", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una matriz no acuosa a la que se puede unir el anticuerpo. Ejemplos de materiales para fase sólida incluyen vidrio, polisacáridos, por ejemplo agarosa, poliacrilamida, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. Ejemplos de formas de fase sólida son el pocillo de una placa de ensayo o una columna de purificación.

El término "oligonucleótido cebador", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia nucleotídica, que es complementaria de una secuencia nucleotídica del gen *dusp6*. Cada cebador hibrida con su secuencia nucleotídica diana y actúa como un sitio de inicio para la polimerización del DNA.

El término "sonda", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia nucleotídica complementaria de una secuencia nucleotídica derivada del gen *dusp6*, que se puede utilizar para detectar esa secuencia nucleotídica derivada del gen *dusp6*.

El término "diana terapéutica" se refiere a secuencias nucleotídicas o peptídicas, contra las que se puede diseñar y aplicar clínicamente un fármaco o compuesto terapéutico.

El término "antagonista" se refiere a cualquier molécula que inhiba la actividad biológica de la molécula antagonizada. Ejemplos de moléculas antagonistas incluyen, entre otros, proteínas, péptidos, variaciones de secuencia de péptidos naturales y pequeñas moléculas orgánicas (de peso molecular inferior a 500 daltons).

La presente invención se basa en el descubrimiento de que tanto la expresión génica de *dusp6*, como la concentración de la proteína DUSP6 se ve incrementada durante la muerte celular de los oligodendrocitos, que son las células responsables de la mielinización del sistema nervioso central; en el descubrimiento de que el bloqueo de la expresión de *dusp6* con un RNA antisense específico de este gen, bloquea el proceso de muerte de los oligodendrocitos, bloqueando por tanto el proceso de desmielinización; y en el descubrimiento de que la expresión génica de *dusp-6* está incrementada en muestras de cerebro post-mortem procedentes de individuos humanos afectados de esclerosis múltiple, al compararla con la expresión en muestras de cerebro post-mortem procedentes de individuos humanos no afectados de esclerosis múltiple.

En este sentido, la presente invención proporciona, en primer lugar, un método *in vitro* para detectar la presencia de enfermedades desmielinizantes en un individuo para determinar el estadio o la severidad de dichas enfermedades en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dichas enfermedades, que comprende:

a) la detección y/o cuantificación de la proteína DUSP6, del mRNA del gen *dusp6* o del correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y

5 b) la comparación de la cantidad de proteína DUSP6, de la cantidad de mRNA del gen *dusp6* o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra de un individuo, con la cantidad de proteína DUSP6, con la cantidad del mRNA del gen *dusp6* o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en las muestras de individuos control o en muestras anteriores del mismo
10 individuo o con los valores normales de referencia.

El método proporcionado por la presente invención es de alta sensibilidad y especificidad, y se basa en que sujetos o individuos diagnosticados de una enfermedad desmielinizante, en especial de esclerosis múltiple, presentan niveles elevados de
15 mRNA transcrito del gen *dusp6* (*niveles elevados de expresión del gen dusp6*), o concentraciones elevadas de la proteína codificada por el gen *dusp6* (*proteína DUSP6*), en comparación con los correspondientes niveles en muestras procedentes de sujetos sin historial clínico de enfermedades desmielinizantes.

20 El presente método comprende una etapa de obtención de la muestra del individuo. Se puede trabajar con distintas muestras fluidas como, por ejemplo: suero, orina, saliva, heces o líquido cefalorraquídeo. La muestra se puede obtener por cualquier método convencional, preferiblemente por resección quirúrgica.

25 Las muestras pueden ser obtenidas de sujetos previamente diagnosticados, o no diagnosticados, de una enfermedad desmielinizante, preferiblemente de esclerosis múltiple; o también de un sujeto en tratamiento, o que ha sido tratado previamente contra una enfermedad desmielinizante, en particular contra la
30 esclerosis múltiple.

El presente método comprende además una etapa de extracción de la muestra, ya sea para obtener el extracto de proteínas de ésta, o bien para obtener el extracto de RNA total. Uno de estos dos extractos representa el material de trabajo para la siguiente
35 fase. Los protocolos de extracción de la proteína total o del RNA

total son bien conocidos por el experto en la materia (Chomczynski P. et al., Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532).

Cualquier ensayo convencional se puede utilizar en el marco de la invención para detectar una enfermedad desmielinizante, siempre que mida *in vitro* los niveles de mRNA transcrito del gen *dusp6* o su cDNA complementario, o la concentración de proteína DUSP6, en muestras recogidas de los individuos a analizar y de individuos control.

Así pues, esta invención proporciona un método para detectar la presencia de enfermedades desmielinizantes, en especial de la esclerosis múltiple, en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dichas enfermedades, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dichas enfermedades, basado bien en la medida de la concentración de la proteína DUSP6, o bien en la medida del nivel de expresión del gen *dusp6*.

En el caso de que lo que se pretenda detectar sea la proteína DUSP6, el método de la invención comprende una primera etapa de puesta en contacto del extracto de proteínas de la muestra con una composición de uno o más anticuerpos específicos contra uno o más epítomos de la proteína DUSP6, y una segunda etapa de cuantificación de los complejos formados por anticuerpos y la proteína DUSP6.

Existe una amplia variedad de ensayos inmunológicos disponibles para detectar y cuantificar la formación de complejos específicos antígeno-anticuerpo; numerosos ensayos de unión de proteínas, competitivos y no competitivos, han sido previamente descritos, y un gran número de estos ensayos está disponible comercialmente.

Así, la proteína DUSP6 se puede cuantificar con anticuerpos como, por ejemplo: anticuerpos monoclonales, policlonales, intactos o fragmentos recombinantes de ellos, "combibodies" y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos, específicos contra la proteína DUSP6; siendo estos anticuerpos humanos, humanizados o de

origen no humano. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no; los anticuerpos no marcados se pueden utilizar en ensayos de aglutinación; los anticuerpos marcados se pueden utilizar en una amplia variedad de ensayos. Las moléculas
5 marcadoras que se pueden utilizar para marcar los anticuerpos incluyen radionucleótidos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes y derivados.

Existe una amplia variedad de ensayos bien conocidos, que se
10 pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent assay o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima),
15 RIA (Radioinmunoassay o Radioinmunoensayo), EIA competitivo (Competitive enzyme immunoassay o Inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (Double antibody sandwich-ELISA o ensayo ELISA sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o
20 microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como *dipsticks*. Otras maneras para detectar y cuantificar la proteína DUSP6, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.

25 El inmunoensayo preferido en el método de la invención es un ensayo ELISA sándwich con doble anticuerpo (*DAS-ELISA*). En este inmunoensayo se puede utilizar cualquier anticuerpo o combinación de anticuerpos, específicos contra uno o más epítopos de la proteína DUSP6. Como ejemplo de uno de los muchos posibles
30 formatos de este ensayo, un anticuerpo, monoclonal o policlonal, o un fragmento de este anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, que recubren una fase sólida, se ponen en contacto con la muestra a analizar, y se incuban durante un tiempo y en condiciones apropiados para formar los complejos antígeno-anticuerpo. Después
35 de un lavado en condiciones apropiadas para eliminar los complejos

no específicos, se incuban con los complejos antígeno-anticuerpo, en condiciones y tiempo apropiados, un reactivo indicador, que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal, o un fragmento de este anticuerpo, o una combinación de estos anticuerpos, unidos a un compuesto generador de una señal. La presencia de la proteína DUSP6 en la muestra a analizar, se detecta y cuantifica, en caso de que exista, midiendo la señal generada. La cantidad de proteína DUSP6 presente en la muestra analizar es proporcional a esa señal.

En el caso de que se pretenda detectar el mRNA o el cDNA correspondiente al gen *dusp6*, y no la proteína, el método de la invención para detectar *in vitro* una enfermedad desmielinizante posee etapas diferentes. Así, una vez obtenida la muestra y extraído el RNA total, según el método de la invención se realiza la detección del mRNA o del correspondiente cDNA del gen *dusp6*, que comprende una primera etapa de amplificación del extracto de RNA total o del correspondiente cDNA sintetizado por transcripción inversa del mRNA, y una segunda etapa de cuantificación del producto de la amplificación del mRNA o del cDNA del gen *dusp6*.

Un ejemplo de amplificación del mRNA, consiste en retrotranscribir el mRNA en cDNA (RT), seguido de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction), usando oligonucleótidos cebadores, siendo las secuencias de los cebadores utilizados las identificadas como SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2; la PCR es una técnica de amplificación de una determinada secuencia nucleotídica (diana) contenida en una mezcla de secuencias nucleotídicas. En la PCR, se utiliza un exceso de una pareja de oligonucleótidos cebadores, que hibridan con las hebras complementarias de la secuencia nucleotídica diana. A continuación, una enzima con actividad polimerasa (DNA Taq Polimerasa) extiende cada cebador, utilizando como molde la secuencia nucleotídica diana. Los productos de la extensión se convierten entonces en secuencias dianas, tras la disociación de la hebra diana original. Nuevas moléculas de cebador hibridan y la polimerasa las extiende; el ciclo se repite para aumentar exponencialmente el número de secuencias diana. Esta técnica está

descrita en las patentes US 4683195 y US 4683202. Se han descrito previamente diversos métodos para detectar y cuantificar los productos de la amplificación por PCR, cualquiera de los cuales puede ser usado en esta invención. En un método preferido de la invención, el producto amplificado se detecta por electroforesis en gel de agarosa, de la manera siguiente: cinco microlitros del producto de la amplificación se someten a una separación por electroforesis en un gel de agarosa a una concentración del 2%, en un tampón TAE 1x a 100 voltios, durante una hora. Tras la electroforesis, el gel se tiñe con bromuro de etidio y el producto de la amplificación se visualiza al iluminar el gel con luz ultravioleta (uv); como alternativa a la tinción, y realización preferida, se puede transferir el producto amplificado a una membrana de nailon por técnicas de *Southern blotting* o *transferencia Southern*, para ser detectado con una sonda específica del cDNA del gen *dusp6*, convenientemente marcada.

En otro ejemplo la detección del mRNA se realiza transfiriendo el mRNA a una membrana de nailon, mediante técnicas de transferencia como por ejemplo Northern-blot o transferencia Northern, y detectándolo con sondas específicas del mRNA o del correspondiente cDNA del gen *dusp6*.

En una realización particular la amplificación y cuantificación del mRNA correspondiente al gen *dusp6* se realiza a la vez mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

El paso final del método de la invención para detectar *in vitro* una enfermedad desmielinizante, en una muestra procedente de un individuo, comprende comparar la cantidad de proteína DUSP6, la cantidad de mRNA del gen *dusp6* o la cantidad del correspondiente cDNA, detectada en una muestra de un individuo, con la cantidad de proteína DUSP6, la cantidad de mRNA del gen *dusp6* o la cantidad del correspondiente cDNA, detectada en las muestras de sujetos control o con los valores normales de referencia.

En su segundo objeto, la invención proporciona un método *in vitro* para identificar y evaluar la eficacia de agentes para

terapia de enfermedades desmielinizantes, en especial de la esclerosis múltiple:

- 5 a) tratar un cultivo primario de oligodendrocitos de nervio óptico de rata con estímulos relevantes a las enfermedades desmielinizantes, preferiblemente con estímulos excitotóxicos como Ampa o Kainato
- b) detectar y cuantificar cambios en la expresión del gen dusp-6 o de la proteína DUSP-6 en las células del cultivo en respuesta a dichos estímulos.
- 10 c) poner en contacto el cultivo primario de oligodendrocitos estimulados obtenidos en la etapa a), con el compuesto candidato, en las condiciones y durante el tiempo apropiados para permitir que interaccionen,
- d) detectar y cuantificar los niveles de la expresión del gen dusp-6 o de la proteína DUSP-6, y
- 15 e) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa d) con los niveles correspondientes en cultivos puros de oligodendrocitos estimulados, no tratados con el compuesto candidato.

20 La cuantificación de los niveles de expresión del gen dusp6 o la proteína DUSP6 se realizan de modo semejante a como se indica en el método de la invención para detectar *in vitro* la presencia de una enfermedad desmielinizante en un individuo.

25 Cuando un agente disminuye los niveles de expresión del gen dusp6 o revierte los efectos de la expresión elevada de dicho gen, preferiblemente frenando el proceso de muerte celular, este agente se convierte en candidato para la terapia de las enfermedades desmielinizantes, en especial de la esclerosis múltiple.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de secuencias
30 nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen dusp6, en métodos de búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de enfermedades desmielinizantes, en especial de la esclerosis múltiple. Dentro de los métodos de búsqueda, resalta la importancia adquirida últimamente por los
35 métodos de screening de fármacos, basados en el binding,

competitivo o no, de la molécula potencial fármaco a la diana terapéutica.

Otro objeto adicional de la invención se refiere al uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *dusp6* para detectar la presencia de enfermedades desmielinizantes, en especial de la esclerosis múltiple, para determinar el estadio o la severidad de dichas enfermedades en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dichas enfermedades.

10

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar agentes caracterizados porque inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína DUSP6. Estos agentes, que se pueden identificar y evaluar según la presente invención, pueden ser seleccionados del grupo formado por:

15

a) un anticuerpo, o combinación de anticuerpos, específicos contra uno o más epítomos presentes en la proteína DUSP6, preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano o humanizado; pudiendo ser también un fragmento del anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla o un anticuerpo anti-idiotipo,

20

b) agentes citotóxicos, tales como toxinas, moléculas con átomos radiactivos, o agentes quimio-terapéuticos, entre los que se incluyen, sin limitación, pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido, ribozimas, siRNAs, moléculas de triple hélice, etc., que inhiben la expresión y/o la actividad de la Proteína DUSP6, como por ejemplo los oligonucleótidos antisentido específicos de *dusp-6* SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4, que inhiben la muerte celular de oligodendrocitos tratados con AMPA, o cualquier oligonucleótido antisentido con una homología con dicha molécula superior al 50%, o cualquier oligonucleótido antisentido específico de *dusp-6* que inhiba su expresión y

25

30

c) compuestos antagonistas de la proteína DUSP6, que inhiben una o más de las funciones de la proteína DUSP6.

Por último, constituye también un objeto de la presente invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes de los mencionados anteriormente junto con uno o más excipientes y/o sustancias transportadoras. Además dicha composición puede contener cualquier otro ingrediente activo que inhiba la función de la proteína DUSP6.

Los excipientes, sustancias transportadoras y sustancias auxiliares tienen que ser farmacéuticamente y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan ser combinados con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan efectos adversos en el organismo tratado. Las composiciones farmacéuticas o formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para la administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración depende del estado del paciente. Las formulaciones pueden ser en forma de dosis sencillas. Las formulaciones se preparan de acuerdo con métodos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de sustancias activas para administrarse pueden variar en función de las particularidades de la terapia.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1.- Análisis diferencial de expresión del gen DUSP-6 en muestras de oligodendrocitos, utilizando los microarrays Rat Genome U34 DNA arrays.

1.1. Materiales y métodos

Microarrays. Se utilizaron los microarrays *GeneChip Test 3* (Affymetrix, Santa Clara), que permiten testar la calidad del RNA, previamente al análisis de expresión con el *GeneChip Rat Genome U34 set* (Affymetrix, Santa Clara), que representa 3322 secuencias completas de genes anotados. El gen *dusp-6* está representado en el microarray por el set de sondas *U42627_at* de Affymetrix, que son

oligonucleótidos sentido de 25 nucleótidos de longitud, diseñados en base a la secuencia U42627 de GeneBank (Tabla 1).

5 Tabla 1. Descripción de las sondas correspondientes al set de sondas U42627_at.

Orden consecutivo de las sondas	Secuencia de la sonda	Posición de la sonda en la secuencia de mRNA del gen
1	SEQ ID NO:5	1557
2	SEQ ID NO:6	1563
3	SEQ ID NO:7	1623
4	SEQ ID NO:8	1713
5	SEQ ID NO:9	1725
6	SEQ ID NO:10	1773
7	SEQ ID NO:11	1827
8	SEQ ID NO:12	1845
9	SEQ ID NO:13	1857
10	SEQ ID NO:14	1863
11	SEQ ID NO:15	1881
12	SEQ ID NO:16	1887
13	SEQ ID NO:17	1935
14	SEQ ID NO:18	1941
15	SEQ ID NO:19	2007
16	SEQ ID NO:20	2013

10 **Muestras.** Las muestras estudiadas correspondían a cultivos primarios de oligodendrocitos obtenidos a partir de nervio óptico de ratas de 12 días. Para evitar variaciones inter-individuales, cada cultivo correspondía a un pool de células de 10 animales. Se hicieron tratamientos, por duplicado, con 10 μ M AMPA (ácido α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropionico) y 3 μ M kainato. La

15 duración de los tratamientos fue de 2, 10 y 15 minutos, recogiendo las células inmediatamente después del tratamiento en los dos primeros casos y 1 hora tras el tratamiento de 15 minutos. El tratamiento durante 10 y 15 minutos con AMPA y con kainato produce apoptosis, mientras que el tratamiento de 2 minutos se

20 consideró subletal por la escasa duración del tratamiento. Tras los tratamientos, las células se recogieron en TRIzol® Reagent

(Life Technologies) y se guardaron a -80°C hasta la extracción del RNA total.

Análisis GeneChip de expresión génica

El análisis se llevó a cabo con RNA total procedente de cultivos de oligodendrocitos. Cada muestra correspondía a la mezcla de los RNA totales procedentes de dos cultivos y se denominaron de la siguiente forma:

- control: oligodendrocitos cultivados sin tratar
- ampa 2: oligodendrocitos tratados durante 2 minutos con $10\mu\text{M}$ AMPA y recogidos tras el tratamiento
- ampa 10: oligodendrocitos tratados durante 10 minutos con $10\mu\text{M}$ AMPA recogidos tras el tratamiento
- ampa 15: oligodendrocitos tratados durante 15 minutos con $10\mu\text{M}$ AMPA y recogidos 60 minutos más tarde
- kainato 2: oligodendrocitos tratados durante 2 minutos con $3\mu\text{M}$ kainato y recogidos tras el tratamiento
- kainato 10: oligodendrocitos tratados durante 10 minutos con $3\mu\text{M}$ kainato y recogidos tras el tratamiento
- kainato 15: oligodendrocitos tratados durante 15 minutos con $3\mu\text{M}$ kainato y recogidos 60 minutos más tarde

Síntesis del cRNA

El RNA total de cada uno de los cultivos se obtuvo homogenizando las células en TRIzol® Reagent (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del proveedor. El RNA total resultante se limpió con el kit RNeasy (QIAGEN) (Chomczynski P. et al., Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532). De cada preparación de RNA total se usaron 2 μg como material de partida para la síntesis de cRNA biotinilado con el kit MessageAmp™ aRNA (Ambion).

Hibridación y escaneado del array

Se fragmentaron 15 μg de cada cRNA biotinilado a 94°C durante 35 minutos en una solución tampón que contenía 40 mM Tris-Acetato (pH 8.1), 100mM KOAc y 30mM MgOAc. El cRNA fragmentado se mezcló con buffer de hibridación (100mM MES, 1M NaCl, 20 mM EDTA, 0.01%

Tween 20) y se calentó a 99° durante 5 minutos y posteriormente a 45°C durante 5 minutos, para a continuación ser cargado en el array de Affymetrix. El primer array en el que se realizó la hibridación fue el Test 3 de Affymetrix. Este array permite testar la calidad del RNA previo al análisis de expresión en el Affymetrix® GeneChip® Rat Genome U34 set (RG-U34).

Para la hibridación, los arrays se incubaron en un horno rotatorio a 45°C durante 16 horas y con una rotación constante de 60 rpm.

El lavado y tinción de cada array se llevó a cabo en la Estación de Fluidos de Affymetrix®. Se usó un programa de lavado y tinción que incluía:

- 10x2 ciclos de lavado con SSPE-T 6x (0.9 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄, 6 mM EDTA, 0.01% Tween 20) a 25°C,
- 4x15 ciclos con 0.1 mM MES, 0.1M NaCl, 0.01% Tween 20 a 50°C ,
- tinción del cRNA biotinilado con un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (10 µg/ml Molecular Probes)
- 10x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 25°C
- tinción con un anticuerpo anti-estreptavidina (3µg/ml, Vector laboratories) durante 10 minutos
- tinción un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (10 µg/ml, Molecular Probes) durante 10 minutos
- 15x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 30°C

Los arrays se escanearon a 560 nm usando un microscopio confocal que utiliza emisión láser (Agilent GeneArray Scanner). El análisis de las lecturas de intensidad se realizó con el software Microarray Suite 5.0. Para la comparación de arrays, éstos fueron escalados a una intensidad total de 100.

1.2. Resultados.

El análisis diferencial de la expresión del gen *dusp-6* en los oligodendrocitos estimulados con respecto al control, se realizó a partir de los datos de comparación de arrays obtenidos utilizando el software de Affymetrix. Los parámetros que se tuvieron en cuenta (en el orden en el que aparecen en la lista) fueron: i)

Detección. Indica si el transcrito está Presente (P), Ausente (A) o Marginal (M), ii) Cambio: Indica si la expresión de un determinado transcrito Aumenta (I), Decrece (D), No Cambia (NC), Aumenta Marginalmente (MI), o Decrece Marginalmente (MD), iii)

- 5 Signal Log Ratio (SLR): Indica el nivel de cambio de expresión entre la línea base (control) y una muestra problema. Este cambio se expresa como el \log_2 del ratio (*fold change* o número de veces que la expresión del gen está elevada o reprimida en la muestra problema-tratada frente a la muestra control-no tratada). Se
- 10 considera significativo un valor de SLR de 1 (equivalente a un *fold change* de 2), para transcritos cuya expresión aumenta frente al control) y de -1, para transcritos cuya expresión disminuye frente al control.

- 15 **Tabla 2. Resultados obtenidos con el Rat Genome U34 array para dusp-6, número de acceso U42627.**

	Señal	Detección	SLR (vs control	Ratio (=2 ^{SL}	Cambio
Control	34.1	P			
AMPA 2	75.3	P	0.8	1.7	I
AMPA 10	101.7	P	1.2	2.3	I
AMPA 15	149.7	P	2.1	4.3	I
Kainato 2	48.4	P	0.6	1.5	I
Kainato 10	43.5	P	0.6	1.5	I
Kainato 15	63.7	P	0.9	1.9	I

1.3. Discusión

- 20 El análisis diferencial de la expresión del gen dusp-6 en los cultivos de oligodendrocitos tratados con AMPA con respecto al control, demostró que los niveles de expresión del gen dusp-6 estaban elevados más de 4 veces (SLR=2.1) en el tratamiento de 15 minutos y más de 2 veces (SLR=1.2) en el tratamiento de 10
- 25 minutos, mientras que el incremento de expresión era menor de dos veces (SLR<1) en los tratamientos con kainato.

- Ejemplo 2.- Análisis diferencial de expresión de la proteína dusp-6 en cultivos de oligodendrocitos, utilizando la técnica RT-PCR**
- 30 cuantitativa en tiempo real.

2.1. Materiales y métodos.

El método empleado consiste en la transcripción inversa del mRNA a cDNA y su posterior amplificación en un equipo *LightCycler* (Roche), utilizando SYBR Green para la detección del producto amplificado. La cuantificación se realiza en tiempo real y permite calcular la expresión relativa de la secuencia en diferentes muestras en la fase de amplificación lineal de la reacción.

Muestras: Se analizaron muestras de cultivos primarios de oligodendrocitos tratados con AMPA. Las muestras procedían de cultivos distintos a los analizados con microarrays de DNA. Se realizaron 4 cultivos:

- control: oligodendrocitos cultivados sin tratar
- ampa 2: oligodendrocitos tratados durante 2 minutos con 10 μ M AMPA y recogidos tras el tratamiento
- ampa 10: oligodendrocitos tratados durante 10 minutos con 10 μ M AMPA recogidos tras el tratamiento
- ampa 15: oligodendrocitos tratados durante 15 minutos con 10 μ M AMPA y recogidos 60 minutos más tarde.
- kainato 2: oligodendrocitos tratados durante 2 minutos con 3 μ M kainato y recogidos tras el tratamiento
- kainato 10: oligodendrocitos tratados durante 10 minutos con 3 μ M kainato y recogidos tras el tratamiento
- kainato 15: oligodendrocitos tratados durante 15 minutos con 3 μ M kainato y recogidos 60 minutos más tarde

Las células se recogieron en TRIzol® Reagent (Life Technologies) y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de la extracción del RNA total.

RT-PCR cuantitativa en tiempo real. El RNA total de cada uno de los cultivos se obtuvo homogenizando las células en TRIzol® Reagent (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del proveedor. El RNA total resultante se limpió con el kit RNeasy (QIAGEN) (Chomczynski P. et al., *Anal. Biochem.*, 1987, 162: 156; Chomczynski P., *Biotechniques*, 1993, 15: 532). Las muestras de RNA total se conservaron a -80°C desde el momento de su obtención

hasta su utilización. El RNA se cuantificó espectrofotométricamente y se digirieron 5 µg de RNA total con DNasaI de Ambion (2U/µl), a una concentración de 2U por µg de RNA, durante 30 minutos a 37°C.

5 **Síntesis de cDNA**

Se utilizó 1 µg de RNA tratado con DNasa como material de partida para la síntesis de la primera hebra de cDNA con la enzima transcriptasa inversa SuperScript™ II RNase (Life Technologies), usando como cebador un oligonucleótido oligo-dT que contenía la
10 secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. Se prepararon alícuotas del cDNA diluido a la concentración de trabajo.

Amplificación

El cDNA sintetizado se amplificó utilizando cebadores
15 específicos del gen dusp-6 de rata (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2), y del gen que codifica la proteína de rata gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, número de acceso NM_017008 (SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:22). Las reacciones de PCR en tiempo real se prepararon utilizando el kit LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green I
20 kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. El programa de amplificación consistía en 1 ciclo de 95°C durante 10 min ("hot start") seguido de 45 ciclos de 95°C (desnaturalización) durante 10 seg, 60°C (anillamiento) durante 5 seg, 72°C (amplificación y adquisición de fluorescencia) durante 10 seg. El
25 programa de análisis de curvas de desnaturalización consistía en un ciclo de un pulso de 95°C, 65°C durante 15 seg, y un pulso de 95°C durante el paso de amplificación y adquisición.

Cuantificación

En primer lugar se determinó la especificidad de los productos
30 de PCR analizando las curvas de desnaturalización. Posteriormente, como medida relativa de la expresión génica, se calculó la relación entre la abundancia de mRNAs transcritos de dusp-6 y la abundancia de transcritos de GAPDH y se normalizó el dato de la relación en cada una de las muestras tratadas en base a los
35 valores de la muestra control. Para calcular la eficiencia de las

reacciones de PCR (dusp-6 y GAPDH) se construyó, para cada secuencia génica, una curva patrón realizada con diluciones seriadas de cDNA. A las concentraciones de cDNA molde para las reacciones en la curva patrón se les dieron valores arbitrarios 2x, 0.5x, 0.2x y 0.02x. Los valores de punto de cruce (crossing point) para cada una de las reacciones se utilizaron para construir la recta patrón: $y=mx+b$, donde m es la pendiente y b es el punto de intersección de la recta en el eje de ordenadas. A partir de los datos de la recta se obtuvieron los valores de concentración de RNA de partida en cada muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$[RNA] = 10^{(Cp-b)/m}$$

donde Cp es el punto de cruce.

Las unidades de la concentración calculada son las mismas que las utilizadas para construir la recta patrón, por lo que en este caso son unidades arbitrarias que desaparecen en posteriores cálculos al tratarse de relaciones.

Los valores de concentración obtenidos para dusp-6 en cada muestra se normalizaron frente a los valores obtenidos para GAPDH (utilizado en este estudio como gen "housekeeping", cuya expresión no varía como consecuencia del tratamiento).

La tasa de cambio en cada punto se obtuvo dividiendo los valores de concentración normalizados frente a los valores de concentración en el control.

2.2. Resultados.

Los resultados de RT-PCR cuantitativa en tiempo real se utilizaron para obtener la tasa de cambio de expresión génica de dusp-6 en muestras de oligodendrocitos tratados respecto al control sin tratar.

30 **Análisis de las curvas de desnaturalización**

El análisis de los productos de PCR demostró la amplificación específica de un producto con temperatura de desnaturalización similar a la estimada según el software empleado para el diseño de los cebadores, *PrimerExpress* (Applied Biosystems) (Figura 1).

35 **Cálculo de la eficiencia de las reacciones de PCR**

De cada una de las 4 diluciones de cDNA se amplificaron dos réplicas y los puntos de corte (Cp) de cada una de ellas se representaron en una gráfica respecto al logaritmo de la concentración de cDNA para construir la recta patrón (Tabla 3 y, figura 2).

Tabla 3. Puntos de corte (Cp) de la amplificación de las 4 diluciones de cDNA para cada réplica amplificadas con los cebadores del gen dusp-6.

[RNA]	Log [RNA]	Cp
2x	0.30103	25.91
2x	0.30103	26.04
0.5x	-0.30103	27.88
0.5x	-0.30103	27.88
0.2x	-0.69897	29.54
0.2x	-0.69897	29.72
0.02x	-1.69897	32.90
0.02x	-1.69897	32.95

10

Cuantificación del cambio de expresión del gen dusp-6

Dos réplicas de cada muestra (control, AMPA2, AMPA10 y AMPA15) se amplificaron con los cebadores específicos de dusp-6 y GAPDH. A partir de los puntos de corte generados en estas amplificaciones (tabla 4) se calcularon los cambios de expresión del gen dusp-6 en las muestras tratadas respecto al control sin tratar (Tabla 5).

15

Tabla 4. Puntos de corte experimentales de dusp-6 en las 4 muestras.

Réplicas	Control	AMPA2	AMPA10	AMPA15
1	31.94	30.46	32.15	29.73
2	31.65	30.54	32.31	29.61
Media	31.795	30.5	32.23	29.67
SD	0.205	0.056	0.113	0.084

Tabla 5. Valores de sobreexpresión (Fold Change) de dusp-6 en las 3 muestras tratadas respecto al control sin tratar

Muestra	Ratio
AMPA 2	1.7
AMPA 10	0.9
AMPA 15	2.7

2.3. Discusión.

Los resultados confirmaron los datos obtenidos en el análisis de expresión génica diferencial con DNA-chips (ejemplo 1), así, la expresión del dusp-6 estaba incrementada en 2.7 veces en el tratamiento con AMPA15. El diferente grado de sensibilidad de las dos técnicas podría explicar la falta de concordancia entre los resultados de RT-PCR cuantitativa y del DNA-chip para la muestra AMPA10 en la que se observaba una ligera sobreexpresión en el ejemplo 1.

Ejemplo 3. Inhibición de la muerte celular en oligodendrocitos tratados con AMPA tras la incubación con oligonucleótidos antisentido contra el gen dusp-6.

3.1. Materiales y métodos.

Para evaluar si el bloqueo de la expression del dusp-6 inhibe la muerte celular de oligodendrocitos tratados con AMPA, se utilizaron oligonucleótidos (ODNs) antisentido capaces de bloquear la expresión de dicho gen.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó en base a la estructura secundaria del RNA, intentando evitar las secuencias que presentan un alto porcentaje de hibridación interno, y con ayuda del soporte informático AO predict (<http://www.cgb.ki.se/AOpredict/>). Para mejorar la eficacia y la capacidad de degradar el RNA y reducir los efectos secundarios se diseñaron oligonucleótidos de última generación, que presentan dos tipos de modificaciones; grupos 2'-O-Metilos en las 6 primeras y últimas bases, y grupos fosforotiodados en las 8 bases intermedias. Además, los oligonucleótidos se marcaron con Texas

Red para poder identificar las células transfectadas con dichos oligonucleótidos.

Se diseñaron tres ODNs antisentido con el objeto de identificar secuencias activas, más un ODN sentido, usado como control negativo. Para mejorar la penetración de los mismos los ODNs se transfectaron usando el kit Lipofectin (Invitrogen).

Tabla con las secuencias de los oligonucleótidos antisentido

ODN1- SEQ ID NO:23

ODN2- SEQ ID NO:3

ODN3- SEQ ID NO:4

Tras 24h después de la siembra, los oligodendrocitos se trataron con una mezcla de ODNs a distintas concentraciones acoplados a los liposomas del kit de transfección.

Tras 24 h, las células se lavaron y se dejaron otras 24 h antes del experimento para asegurar del bloqueo total de la proteína en estudio. Posteriormente, se añadió el estímulo excitotóxico, AMPA 10 μ M + CTZ 100 μ M, durante 15 min y se valoró el efecto protector de los distintos ODNs tras 6h.

3.2. Resultados.

Se observaron porcentajes de transfección de los ODNs en torno al 50%.

Para poner a punto la técnica se diseñaron ODNs antisentido contra la caspasa-3, mediadora del proceso de muerte oligodendroglial inducido por con AMPA 10 μ M + CTZ 100 μ M. De entre los 3 ODNs diseñados contra la caspasa-3, se consiguió bloquear el efecto del estímulo excitotóxico con el ODN 2, demostrando la validez del método (Fig. 3A).

A continuación, se diseñaron ODNs antisentido contra dusp-6 y se transfectaron cultivos de oligodendrocitos según lo descrito anteriormente. Así, la muerte oligodendroglial tras estimulación con AMPA 10 μ M + CTZ 100 μ M fue significativamente inhibida en presencia de los ODNs antisentido 2 ($p < 0.01$; $n=5$) y 3 ($p < 0.05$; $n=3$) contra dusp-6 (Fig. 3B).

3.3. Discusión.

Los ensayos realizados demostraron que dusp-6 contribuye al proceso de muerte oligodendroglial, ya que el bloqueo de la expresión de dicho gen inhibía la muerte celular inducida por el tratamiento con AMPA.

- 5 Los resultados sugirieron también que el oligonucleótido antisentido específico del gen dusp-6, que inhibía la muerte celular en oligodendrocitos tratados con AMPA tras la incubación, podría ser una molécula activa farmacológicamente en el tratamiento de las enfermedades desmielinizantes, preferiblemente la esclerosis múltiple.

Ejemplo 4.- Análisis de comparación de las secuencias de Dusp6 de rata y humano.

4.1. Materiales y métodos

- 15 Con el objetivo de comparar el grado de homología de las secuencias humana y de rata del gen Dusp6 se realizó un alineamiento de secuencias nucleotídicas. La secuencia de Dusp6 de rata se comparó con la secuencia de Dusp6 humana. Se compararon tanto las secuencias nucleotídicas como las secuencias aminoácidas.

Las secuencias nucleotídicas a comparar fueron:

- Dusp6 de rata, número de acceso GenBank, NM_053883;
- Dusp6 humana, número de acceso GeneBank, NM_001946.

Las secuencias aminoácidas a comparar fueron:

- 25 - Dusp6 de rata, número de acceso GenBank, NP_446335.;
- Dusp6 humana, número de acceso GeneBank, NP_001937.

El alineamiento se realizó utilizando herramientas informáticas disponibles en la página web <http://biobug.life.nthu.edu.tw/~tswang/pw-fasta/>.

30 4.2. Resultados

Los resultados de los alineamientos de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas se muestran en las figuras 4 y 5, respectivamente.

4.3. Discusión

El alineamiento de las secuencias NM_001946 (dusp6 humana) y NM_053883 (dusp6 de rata) reveló un grado de identidad del 86.713% sobre un solapamiento de secuencia de 1716 nucleótidos.

- 5 En cuanto a la comparación de las secuencias aminoacídicas, el grado de identidad entre las secuencias NP_001937 (DUSP6 humana) y NP_446335 (DUSP6 de rata) fue de 98.425% sobre un solapamiento de 381 aminoácidos.

10 **Ejemplo 5. Expresión del gen dusp 6 en tejido humano postmortem de individuos control y de pacientes con esclerosis múltiple.**

5.1. Materiales y métodos.

- Se empleó RT-PCR cuantitativa en tiempo real para valorar si la expresión de dusp 6 estaba alterada en el sistema nervioso central de personas que sufrieron esclerosis múltiple en vida, en comparación con individuos control, emparejados por edad y sexo, y que murieron sin sufrir alteraciones neurológicas manifiestas.

- Las muestras de tejido se obtuvieron de nervios ópticos disecados antes de las 8 horas de la muerte, y se congelaron en nitrógeno líquido. El ARN total se extrajo con Trizol (Invitrogen, Paisley, UK) y el ADNc se sintetizó con un kit de retrotranscripción (Applied Biosystems, Madrid, Spain) empleando hexámeros al azar. La amplificación por RT-PCR cuantitativa en tiempo real se realizó con el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000 con los cebadores SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO:25, que se diseñaron con el software PrimerExpress (Applied Biosystems). La cantidad de ADNc se calculó mediante curvas estándar de un stock de ADNc de corteza cerebral humana. Como genes endógenos de referencia se emplearon la ciclofilina C, GAPDH, r18S, ubiquitina C, HRPT1 y 2- β -microglobulina, de forma que se pudieran hacer comparaciones fiables entre las diferentes muestras ensayadas. La expresión de los genes diana se normalizó mediante un factor que se obtuvo con un algoritmo que genera un promedio geométrico de los cinco genes endógenos empleados como referencia (Vandesompele et al., 2002 Genome Biol 3:1-12). Los resultados se muestran en la

figura 6; los datos se expresan como incremento de los valores medidos en cada pareja de muestras, enfermo y control, y en promedio \pm SEM en el conjunto de la población. La comparación estadística se realizó mediante el test de la t de Student no emparejado, de una cola.

5.2. Resultados.

El análisis de RT-PCR cuantitativa reveló que el gen dusp 6 se expresaba de forma variable en todas las muestras ensayadas, en comparación con la expresión de los cinco genes endógenos empleados como referencia. En su conjunto, se observó que la expresión de dusp 6 aumentaba en el grupo de muestras de pacientes afectados de esclerosis múltiple un $43.83 \pm 0.28 \%$, en comparación con el grupo de muestras de individuos control ($p=0.074$, $n=13$; Fig. 6).

5.3. Discusión.

Estos resultados muestran que la expresión de dusp6 aumenta en la población de muestras de nervio óptico de esclerosis múltiple examinada. Al ser los oligodendrocitos el componente celular predominante en el nervio óptico, el aumento en la expresión de dusp6 se debe con toda probabilidad a niveles más elevados de este transcrito en estas células. Esto sugiere que los oligodendrocitos en la esclerosis múltiple son más vulnerables a la muerte celular ya que la proteína dusp6 se ha asociado al daño celular y la apoptosis (Rossig et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:25502-25507).

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para detectar la presencia de enfermedades desmielinizantes en un individuo, para determinar el estadio o la
5 severidad de dichas enfermedades en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dichas enfermedades, que comprende:

a) la detección y/o cuantificación de la proteína DUSP6, del mRNA del gen *dusp6* o del correspondiente cDNA en una muestra de dicho
10 individuo, y

b) la comparación de la cantidad de proteína DUSP6, de la cantidad de mRNA del gen *dusp6* o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra de un individuo, con la cantidad de proteína DUSP6, con la cantidad del mRNA del gen *dusp6* o con la
15 cantidad del correspondiente cDNA detectada en las muestras de individuos control o con los valores normales de referencia.

2. Método según la reivindicación 1 en el que las enfermedades desmielinizantes son, entre otras, esclerosis múltiple, síndrome de
20 Devic, enfermedad de Baló, enfermedad de Marchiafava-Bignami, mielinolisis central pontina, encefalomyelitis aguda diseminada o encefalomyelitis hemorrágica necrotizante aguda.

3. Método según las reivindicaciones anteriores en el que dicha
25 muestra es de suero, orina, saliva, heces o líquido cefalorraquídeo.

4. Método según la reivindicación 3 en el que dicha muestra de suero, orina, saliva, heces o líquido cefalorraquídeo a analizar se obtiene por cualquier método convencional, preferiblemente resección
30 quirúrgica.

5. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo al que no se le ha diagnosticado previamente una enfermedad desmielinizante.

.... 6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo al que se le ha diagnosticado previamente una enfermedad desmielinizante, preferiblemente esclerosis múltiple.

5

7. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo en tratamiento, o que ha sido tratado previamente contra una enfermedad desmielinizante, preferentemente esclerosis múltiple.

10

8. Método según la reivindicación 1 caracterizado porque comprende la realización de una extracción de la muestra, bien para obtener un extracto de proteínas o bien para obtener un extracto que consiste en el RNA total.

15

9. Método según la reivindicación 8 caracterizado porque la detección de la proteína DUSP6 comprende una primera etapa de puesta en contacto del extracto de proteínas de la muestra con una composición de uno o más anticuerpos específicos contra uno o más epítopos de la proteína DUSP6, y una segunda etapa de cuantificación de los complejos formados por los anticuerpos y la proteína DUSP6.

20

10. Método según la reivindicación 9 caracterizado porque dichos anticuerpos comprenden anticuerpos monoclonales, policlonales, intactos o fragmentos recombinantes de ellos, "combibodies" y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos, específicos contra la proteína DUSP6; siendo estos anticuerpos humanos, humanizados o de origen no humano.

25

11. Método según las reivindicaciones 9 o 10 caracterizado porque para la cuantificación de los complejos formados por los anticuerpos y la proteína DUSP6 se utilizan técnicas seleccionadas del grupo formado por Western-blot, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay o ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (Radioinmunoassay o Radioinmunoensayo), EIA Competitivo (Competitive

30

35

Enzyme Immunoassay o Inmunoensayo Enzimático Competitivo), DAS-ELISA (Double antibody Sandwich-ELISA o ensayo ELISA Sándwich con Doble Anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos, ensayos basados en precipitación con oro coloidal en formatos tales como *dipsticks*; o mediante técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.

10 12. Método según la reivindicación 8 caracterizado porque la detección del mRNA o del correspondiente cDNA del gen *dusp6* comprende una primera etapa de amplificación del mRNA, incluido en el extracto de RNA total, o del correspondiente cDNA sintetizado por transcripción inversa del mRNA, y una segunda etapa de cuantificación del producto
15 de la amplificación del mRNA o del cDNA del gen *dusp6*.

13. Método según la reivindicación 12 caracterizado porque la amplificación se realiza de manera cualitativa o cuantitativa, mediante RT-PCR usando oligonucleotidos cebadores, siendo las
20 secuencias de los cebadores utilizados para amplificar la secuencia del gen *dusp6* SEQ. ID. NO:1 y SEQ. ID. NO:2, o cualquier otra pareja de cebadores que amplifique *dusp-6* específicamente.

14. Método según la reivindicación 8 caracterizado porque la
25 detección se realiza con sondas específicas del mRNA o del correspondiente cDNA del gen *dusp6*, mediante técnicas como por ejemplo Northern-blot o transferencia Northern.

15. Método según la reivindicación 8 caracterizado porque la
30 detección del mRNA se efectúa mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

16. Uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *dusp6* para detectar *in vitro* la presencia de una enfermedad
35 desmielinizante en un individuo, en especial de esclerosis múltiple,

para determinar *in vitro* el estadio o la severidad de dichas enfermedades desmielinizantes en el individuo, o para monitorizar *in vitro* el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dichas enfermedades desmielinizantes.

5

17. Método *in vitro* para identificar y evaluar la eficacia de compuestos para terapia de enfermedades desmielinizantes, preferiblemente de la esclerosis múltiple, que comprende:

- 10 a) tratar un cultivo primario de oligodendrocitos de nervio óptico de rata con estímulos relevantes a las enfermedades desmielinizantes, preferiblemente con estímulos excitotóxicos como Ampa o Kainato
- 15 b) detectar y cuantificar cambios en la expresión del gen *dusp-6* o de la proteína DUSP-6 en las células del cultivo en respuesta a dichos estímulos.
- c) poner en contacto el cultivo puro de oligodendrocitos estimulados obtenidos en la etapa a), con el compuesto candidato, en las condiciones y durante el tiempo apropiados para permitir que interaccionen,
- 20 d) detectar y cuantificar los niveles de la expresión de los niveles de expresión del gen *dusp-6* o de la proteína DUSP-6, y
- 25 e) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa d) con los niveles correspondientes en cultivos puros de oligodendrocitos estimulados, no tratados con el compuesto candidato.

18. Uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *dusp6*, en métodos de búsqueda, identificación, desarrollo y
30 evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de enfermedades desmielinizantes, preferiblemente para esclerosis múltiple.

19. Agente caracterizado porque inhibe la expresión y/o la actividad de la proteína DUSP6, o porque inhibe los efectos letales de
35 la inducción de la expresión de la proteína DUSP6.

20.. Agente según la reivindicación 19 seleccionado del grupo formado por:

5 a) un anticuerpo, o combinación de anticuerpos, específicos contra uno o más epítomos presentes en la proteína DUSP6, preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano o humanizado; pudiendo ser también un fragmento del anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla o un anticuerpo anti-idiotipo,

10 b) agentes citotóxicos, tales como toxinas, moléculas con átomos radiactivos, o agentes quimio-terapéuticos, entre los que se incluyen, sin limitación, pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido, ribozimas, moléculas de triple hélice, RNA de interferencia (*small*
15 *interference RNA*), RNA de doble hebra, etc., que inhiben la expresión y/o la actividad de la Proteína DUSP6, como por ejemplo los oligonucleótidos antisentido específicos de dusp-6 SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 o cualquier oligonucleótido antisentido con una homología con dichas moléculas superior al 50%, o cualquier oligonucleótido antisentido específico de dusp-6 que inhiba su
20 expresión y

c) compuestos antagonistas de la proteína DUSP6, que inhiben una o más de las funciones de la Proteína DUSP6.

21. Agente según las reivindicaciones 19 ó 20 para el
25 tratamiento de enfermedades desmielinizantes, en especial la esclerosis múltiple.

22. Uso de los agentes según las reivindicaciones 19 ó 20 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades
30 desmielinizantes, en especial de la esclerosis múltiple.

23. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes según las reivindicaciones 19 ó 20 junto con al menos un excipiente
35 farmacéuticamente aceptable.

24. Composición farmacéutica según la reivindicación 23 caracterizada porque contiene otro ingrediente activo, preferiblemente uno que inhiba la función de la proteína DUSP6.

RESUMEN

**MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO IN VITRO Y PRONÓSTICO IN VITRO DE
5 ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES, Y PARA EL DESARROLLO DE FÁRMACOS
CONTRA ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES.**

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para
detectar la presencia de enfermedades desmielinizantes en un
10 individuo, para determinar el estadio o la severidad de dichas
enfermedades en el individuo, o para monitorizar el efecto de la
terapia administrada a un individuo que presente dichas enfermedades;
a la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia
de compuestos para terapia de dichas enfermedades, con el fin de
15 desarrollar nuevos medicamentos; así como a agentes que inhiben la
expresión y/o la actividad de la proteína DUSP6, y/o los efectos de
esta expresión. Los métodos y agentes de la invención se aplican
preferentemente a la esclerosis múltiple.

FIGURA 1a

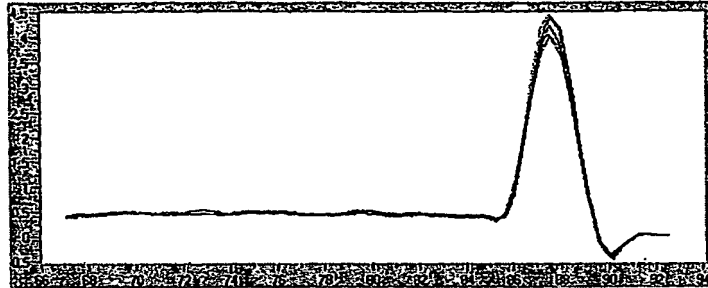


FIGURA 1b

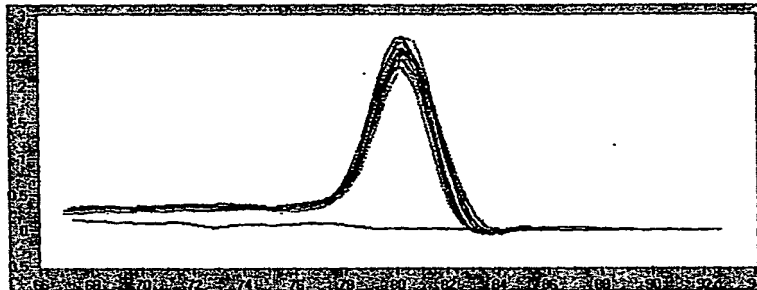


FIGURA 2

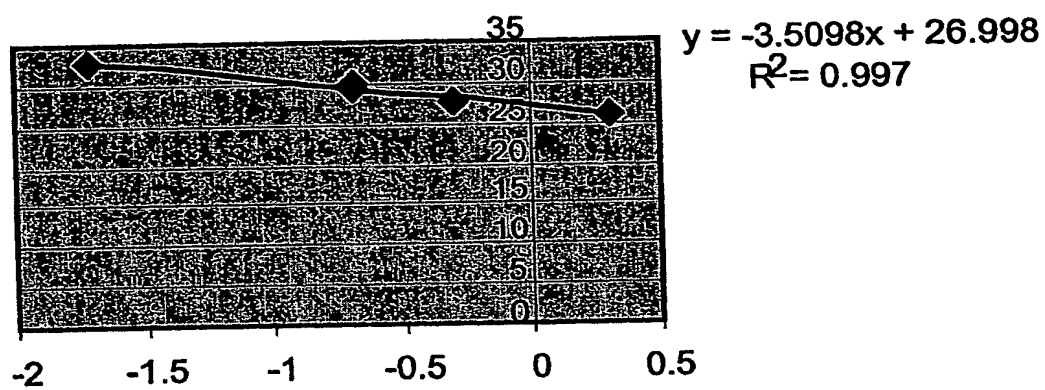


FIGURA 3

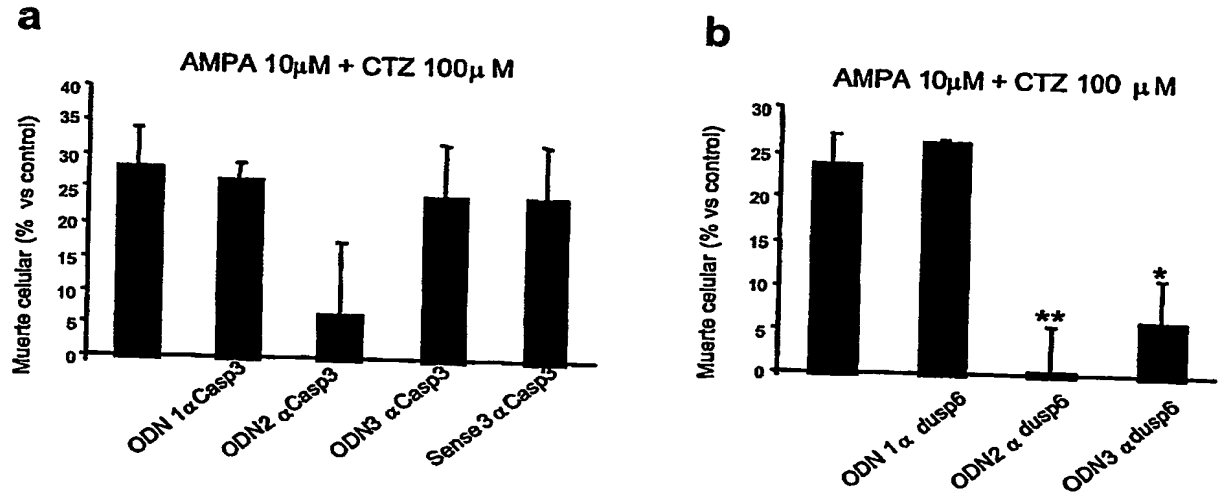


FIGURA 4

86.713% identity (88.783% ungapped) in 1716 nt overlap
(172-1875:189-1876)

	150	160	170	180	190	200
human	CACTAAGAGCCAGCGCTGCAGCTGGTGCAGAGAGAACCTCCGGCTTTGACTTCTGTCTCG					
				::::	:	:
rat	GATTCATTGACTCTGAGAGTGATCTGGTGCAGAGGGACCACCGGCTTGGCTTCTG--TCG					
	160	170	180	190	200	210
human	210	220	230	240	250	260
	TCTGCCCCAAGGCCGCTAGCCTCGGCTTGGGAAGGCGAGGCGGAATTAAACCCCGCTCCG					
	::	::	::	::	::	::
rat	CCTTCCCTAA--CCGCTAGCTTCGGCTTGGGAA----AGGCCGAATCAAACCCGGCTCCG					
	220	230	240	250	260	270
human	270	280	290	300	310	320
	AGAG--CGCACGTTGCGCGCGGGTGCCTGCGCCATTGCCTGCCCGAGGGGCGTCTGGTAG					
	::::	:	:	:	:	:
rat	AGAGCCGGAGCTTCTCACGGCTTGC--TTGGCCTATGCCTCGCTCGAGGGGCGTCTGCTAG					
	280	290	300	310	320	
human	330	340	350	360	370	380
	GCACCCCGCCCTCTCCCGCAGCTCGACCCCATGATAGATACGCTCAGACCCGTGCCCTT					
	::::	::::	::::	::::	::::	::::
rat	GCACCCCGCCTTCTCTGCAGCTCGACCCCATGATAGATACGCTCAGACCCGTGCCCTT					
	330	340	350	360	370	380
human	390	400	410	420	430	440
	CGCGTCGGAATGGCGATCAGCAAGACGGTGGCGTGGCTCAACGAGCAGCTGGAGCTGGG					
	::::	::::	::::	::::	::::	::::
rat	CGCGTCGGAATGGCGATCAGCAAGACGGTGGCGTGGCTCAACGAGCAGCTGGAGCTGGG					
	390	400	410	420	430	440
human	450	460	470	480	490	500
	CAACGAGCGGCTGCTGCTGATGGACTGCCGGCCGAGGAGCTATACGAGTCGTCGCACAT					
	::::	:	:	:	:	:
rat	CAACGAACAGCTGCTGCTGATGGACTGCCGACCGCAGGAGCTGTACGAGTCGTCGCACAT					
	450	460	470	480	490	500
human	510	520	530	540	550	560
	CGAGTCGGCCATCAACGTGGCCATCCCGGGCATCATGCTGCGGCGCCTGCAGAAGGGTAA					
	::	:	:	:	:	:
rat	CGAATCTGCCATCAACGTGGCCATCCCGGGCATCATGCTGCGGCGCTGCAGAAGGGCAA					
	510	520	530	540	550	560
human	570	580	590	600	610	620
	CCTGCCGGTGCAGCGCTCTTACGCGCGGCGAGGACCGGGACCGCTTACCCGGCGCTG					
	::::	::::	::::	::::	::::	::::
rat	CCTGCCGGTGCAGCGCTATTACGCGCTGCGAGGACCGGGACCGCTTACAGGCGCTG					
	570	580	590	600	610	620
human	630	640	650	660	670	680
	TGGCACCACACAGTGGTGCTCTACGACGAGAGCAGCAGCGACTGGAACGAGAATACGGG					
	::::	::::	::::	::::	::::	::::
rat	CGGCACCACACCGTGGTGCTCTACGACGAGAACAGCAGCGACTGGAATGAGAACACAGG					
	630	640	650	660	670	680
human	690	700	710	720	730	740
	CGGCGAGTCGTTGCTCGGGCTGCTGCTCAAGAAGCTCAAGGACGAGGGCTGCCGGGCGTT					
	::	::::	:	:	:	:

```

rat   TGGAGAGTCGGTCTCGGGCTGCTGCTCAAGAACTCAAAGACGAGGGCTGCCGGGCGTT
      690      700      710      720      730      740
      750      760      770      780      790      800
human CTACCTGGAAGGTGGCTTCAGTAAGTTCCAAGCCGAGTTCTCCCTGCATTGCGAGACCAA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rat   CTACCTTGAAGGTGGCTTCAGTAAGTTCCAGGCCGAGTTCCGCCCTGCACTGCGAGACCAA
      750      760      770      780      790      800
      810      820      830      840      850      860
human TCTAGACGGCTCGTGTAGCAGCAGCTCGCCGCCGTTGCCAGTGCTGGGGCTCGGGGGCCT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rat   TCTAGACGGCTCGTGCAGCAGCAGCTCCCCGCCCTTGCCAGTGCTGGGACTCGGGGGCCT
      810      820      830      840      850      860
      870      880      890      900      910      920
human GCGGATCAGCTCTGACTCTTCCTCGGACATCGAGTCTGACCTTGACCGAGACCCCAATAG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rat   GAGGATCAGCTCCGACTCTTCCTCGGACATTGAGTCTGACCTTGACCGAGACCCCAATAG
      870      880      890      900      910      920
      930      940      950      960      970      980
human TGCAACAGACTCGGATGGTAGTCCGCTGTCCAACAGCCAGCCTTCCTTCCCAGTGGAGAT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rat   TGCAACGGACTCCGATGGCAGCCCGCTGTCCAACAGCCAGCCTTCCTTCCCAGTGGAGAT
      930      940      950      960      970      980
      990      1000      1010      1020      1030      1040
human CTTGCCCTTCCTCTACTTGGGCTGTGCCAAAGACTCCACCAACTTGACGCTGTTGGAGGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rat   TTTGCCCTTCCTTTACCTGGGCTGTGCCAAGGACTCTACTAAGTGGACGCTGTTGGAAGA
      990      1000      1010      1020      1030      1040
      1050      1060      1070      1080      1090      1100
human ATTCGGCATCAAGTACATCTTGAACGTCACCCCAATTTGCCGAATCTCTTTGAGAACGC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rat   GTTTGGCATCAAGTACATCTTGAACGTCACCCCAATCTGCCAATCTGTTTGAGAATGC
      1050      1060      1070      1080      1090      1100
      1110      1120      1130      1140      1150      1160
human AGGAGAGTTTAAATACAAGCAAATCCCCATCTCGGATCACTGGAGCCAAAACCTGTCCCA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rat   AGGGGAGTTCAAGTACAAGCAAATTCCTATCTCTGATCACTGGAGCCAAAACCTGTCCCA
      1110      1120      1130      1140      1150      1160
      1170      1180      1190      1200      1210      1220
human GTTTTCCCTGAGGCCATTTCTTTCATAGATGAAGCCCGGGCAAGAACTGTGGTGTCTT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rat   GTTTTCCCTGAGGCCATTTCTTTCATAGATGAAGCCCGAGGCAAAAACCTGTGGTGTCTT
      1170      1180      1190      1200      1210      1220
      1230      1240      1250      1260      1270      1280
human GGTACATTGCTTGGCTGGCATTAGCCGCTCAGTCACTGTGACTGTGGCTTACCTTATGCA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rat   GGTGCATTGCTTGGCGGCATCAGCCGCTCCGTACGGTGACAGTGGCTTACCTTATGCA
      1230      1240      1250      1260      1270      1280
      1290      1300      1310      1320      1330      1340
human GAAGCTCAATCTGTGATGAACGATGCCTATGACATTGTCAAATGAAAAATCCAACAT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
rat   GAAGCTCAACTTGTCCATGAACGATGCTTATGACATTGTCAAATGAAGAAGTCCAACAT

```

	1290	1300	1310	1320	1330	1340
		1350	1360	1370	1380	1390
human	ATCCCCTAACTTCAACTTCATGGGTGCTGCTGGACTTCGAGAGGACGCTGGGACTCAG					
	:: :: :::::::::::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::					
rat	CTCTCCCAACTTCAACTTCATGGGCCAGCTGCTTGACTTTGAAAGGACCCTGGGACTCAG					
	1350	1360	1370	1380	1390	1400
		1410	1420	1430	1440	1450
human	CAGCCCATGTGACAACAGGGTTCAGCACAGCAGCTGTATTTTACCACCCCTTCCAACCA					
	:::::::: :::::::::: :: :: :::::::::: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::					
rat	CAGCCCCTGTGACAATCGTGTCCCGCACAGCAGCTCTACTTCACCGCGCCCTCCAACCA					
	1410	1420	1430	1440	1450	1460
		1470	1480	1490	1500	1510
human	GAATGTATACCAGGTGGACTCTCTGCAATCTACGTGAAAGACCCACACCCCTCCTTGCT					
	:::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :: :: :: :: :: :: :: ::					
rat	GAATGTCTACCAAGTGGACTCCCTGCAATCTACGTGAAAGGCACC-CACCTTTCCTAGCC					
	1470	1480	1490	1500	1510	1520
		1530	1540	1550	1560	1570
human	GGAATGTGTCTGGCCCTTCAGCAGTTTCTCTT-GGCAGCATCAGCTGGGCTGCTTTCTTT					
	:: :: :::::::::: :: :: :::::::::: :::::::::: :: :: :::::::::: :: :: ::::::::::					
rat	GGGA-GTGTCT--CATTCCTTCAGTTTCTCTTGGGCAGCATCGACCAGGCTGCTTTCTTT					
	1530	1540	1550	1560	1570	1580
	1580	1590	1600	1610	1620	1630
human	GTGTGTGGCCCCAGGTGTC-AAAATGACACCAGCTGTCTGTACTAGACAAGGTTACCAAG					
	:::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :: :: :: :: :: :: :: ::					
rat	GTGTGTGGCCCCAGGTGTCAAAATGTCACCAGCTGTCTGTATTAGACAAGGTTGCCAAG					
	1590	1600	1610	1620	1630	1640
	1640	1650	1660	1670	1680	1690
human	TGCGGAATTGGTTAATACTAACAGAGAGATTGCTCCATTC-----TCTTTGGAATAACA					
	::: :::::::::: :: :: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :: :: :: :: :: :: :: ::					
rat	TGCAAAATTGGTTATTACGGAGGGAGAGATTGCTCCATTCATTGTTTTTTTGAAGGACA					
	1650	1660	1670	1680	1690	1700
	1700	1710	1720	1730	1740	1750
human	GGACATGCTGTATAGATACAGGCAGTAGGTTTGC-TCTGTACCCATGTGTACAGCCTACC					
	:: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :: :: :: :: :: :: :: ::					
rat	GGGTATGCTGTCTAGATCCAGGCAATAGGTTTGTCTTTGTACCC-----CAGCCTACC					
	1710	1720	1730	1740	1750	
	1760	1770	1780	1790	1800	
human	CATGCAGGGACTGGGATTCGAGGACTTCCAG---GCGCATAGGGTAGAACCAAATGATAG					
	:: :::::::::: :: :: :::::::::: :: :: :::::::::: :: :: :::::::::: :: :: ::::::::::					
rat	CAAGCAGGGACTGGACCTC-----CATCCAGATAGAGGGTAGGACA-AAGGAGCCG--GG					
	1760	1770	1780	1790	1800	1810
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
human	GGTAGGAGCATGTGTTCTTTAGGGCCTTGTAAGGCTGTTTCCTTTTGCATCTGGAAGTGA					
	:: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :: :: :: :: :: :: :: ::					
rat	GATAGGAGCATGTGTTCTTTAGGGCCACATATGGCTGTTTCCTGTGTCATCTGGAACCAA					
	1820	1830	1840	1850	1860	1870
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
human	CTATATAATTGTCTTCAAGTGAAGACTAATTCAATTTTGCATATAGAGGAGCCAAAGAGA					
	::::::::					
rat	CTATATTGTCTTCAGTGAAGACTGATTCAACTTTGCGTATAGTGGAGCCAAAGAGATTTT					

1880

1890

1900

1910

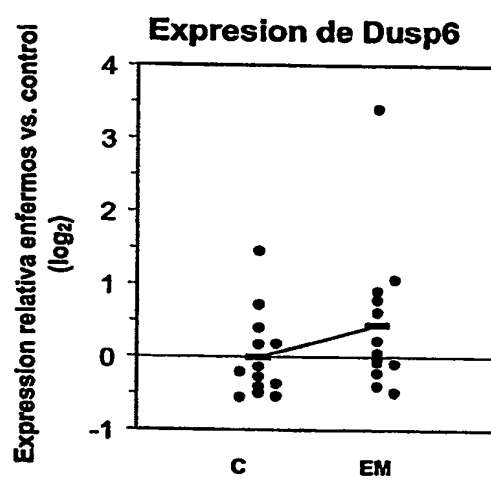
1920

1930

FIGURA 5

		98.425% identity (98.425% ungapped) in 381 aa overlap (1-381:1-381)					
		10	20	30	40	50	60
human		MIDTLRPVPFASEMAISKTVAWLNEQLELGNERLLLMDCRPQELYESSHIESAINVAIPG					
						
rat		MIDTLRPVPFASEMAISKTVAWLNEQLELGNELLLMDCRPQELYESSHIESAINVAIPG					
		10	20	30	40	50	60
		70	80	90	100	110	120
human		IMLRRLOKGNLPVRALFTRGEDRDRFTRRCGTDTVVLYDESSSDWNENTGGESLLGLLLK					
						
rat		IMLRRLOKGNLPVRALFTRCEDRDRFTRRCGTDTVVLYDENSSDWNENTGGESVLGLLLK					
		70	80	90	100	110	120
		130	140	150	160	170	180
human		KLKDEGCRAFYLEGGFSKFQAEFSLHCETNLDGSCSSSSPPLPVLGLGGLRISSDSSSDI					
						
rat		KLKDEGCRAFYLEGGFSKFQAEFALHCETNLDGSCSSSSPPLPVLGLGGLRISSDSSSDI					
		130	140	150	160	170	180
		190	200	210	220	230	240
human		ESDLDRDPNSATDSGSPLSNSQPSFPVEILPFLYLGCADSTNLDVLEEFGIKYILNVT					
						
rat		ESDLDRDPNSATDSGSPLSNSQPSFPVEILPFLYLGCADSTNLDVLEEFGIKYILNVT					
		190	200	210	220	230	240
		250	260	270	280	290	300
human		PNLPNLFENAGEFKYKQIPISDHWSQNLSQFFPEAISFIDEARGKNCVGVHCLAGISRS					
						
rat		PNLPNLFENAGEFKYKQIPISDHWSQNLSQFFPEAISFIDEARGKNCVGVHCLAGISRS					
		250	260	270	280	290	300
		310	320	330	340	350	360
human		VTVTVAYLMQKLNLSMNDAYDIVKMKKSNI SPNFNFMGQLLDFERTLGLSSPCDNRVPAQ					
						
rat		VTVTVAYLMQKLNLSMNDAYDIVKMKKSNI SPNFNFMGQLLDFERTLGLSSPCDNRVPAQ					
		310	320	330	340	350	360
		370	380				
human		QLYFTTPSNQNVYQVDSLQST					
						
rat		QLYFTAPSNQNVYQVDSLQST					
		370	380				

FIGURA 6



Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/014814

International filing date: 28 December 2004 (28.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP
Number: 03380310.7
Filing date: 30 December 2003 (30.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 11 August 2005 (11.08.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.